

令和元年6月17日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05306

研究課題名(和文) 消化管ペプチドによる新たな循環調節機構と多様な作用の解明

研究課題名(英文) Investigation of cardiovascular regulation and multiple function of gastrointestinal peptides

研究代表者

宮里 幹也 (MIYAZATO, Mikiya)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号：50291183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：消化管ペプチドによる新たな循環調節機構と多様な作用を明らかにすることを目的として、1)迷走神経求心路を介する循環制御ネットワークに關与する新規ペプチドの探索(迷走神経節に発現するオーファン受容体に対する内因性リガンドの探索)、2)ニューロメジン類とその関連ペプチドの機能解明(NMU precursor-related peptide; NURPの同定と機能解析)、3)循環器およびその関連疾患モデル動物における生理活性ペプチドの治療応用の検討(血管内皮特異的C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)過剰発現マウスの高脂肪食性肥満に対する作用)に関する研究を推進した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者の研究室では、生体内に存在する新たな生理活性ペプチドを同定し、その機能を解明することにより、未知の生体機能調節機構を明らかにすることをテーマとして研究を進めてきた。今回、NURPと命名した新規ペプチドの発見に成功し、生体内の新たな調節機構を提示することができた。また、既知ペプチドであるCNPによる肥満およびその関連疾患に対する治療標的としての可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To clarify the cardiovascular regulation and multiple functions of gastrointestinal peptides, 1) we searched for the endogenous ligands of the orphan receptors expressed in the vagal nerve ganglion, 2) we identified a novel peptide, neuromadin U precursor-related peptide (NURP), from rat brain and small intestine, and analyzed its function, and 3) we generated endothelial cell-specific C-type natriuretic peptide (CNP) transgenic mice and analyzed their effect in high fat diet-induced obesity.

研究分野：ペプチド化学

キーワード：ペプチド ニューロメジン 自律神経

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者の研究室では、生体内に存在する新たな生理活性ペプチドを同定し、その機能を解明することにより、未知の生体機能調節機構を明らかにすることをテーマとして研究を進めており、近年では、グレリンの発見、ニューロメジン U (NMU) やニューロメジン S (NMS) の同定に成功し、これらによる生体機能調節機構解明を進めてきた。

グレリンは胃から発見されたペプチドであり、NMU は脊髄から同定されたが、小腸において高い含量を示す消化管ペプチドである。グレリンは強力な摂食促進作用に加え、心血管系に対しては主に迷走神経求心路を介し中枢性の自律神経調節作用による循環制御を行う。急性心筋梗塞モデルマウスにおいて、外因性および内因性のグレリンは、迷走神経求心路を介してシグナルを延髄に伝達し、その強力な交感神経抑制作用により、致死性不整脈を減少させ生存率を改善することを示した。また、大動脈縮窄術による心肥大モデルマウスにおいて、心臓局所における炎症に対して、グレリンは副交感神経を賦活化することによる抗炎症作用により、心肥大を抑制することを明らかにした。以上は、グレリンが迷走神経求心路を介する自律神経制御による新たな機序の循環器疾患治療薬としての可能性を有することを示している。

一方、NMU は中枢性の摂食抑制ペプチドであるが、脳室内や脳幹部投与により交感神経活性化を介した血圧と心拍数の上昇作用を示す。また、NMU と 2 種類の受容体を共有する NMS は我々が発見したペプチドで、mRNA はラット脳では視床下部に局限して発現しているが、NMS ペプチドは視床下部に加えて脳幹部にて高い含量を認めることを明らかにし、脳幹部において NMS が新たな機能を発揮する可能性を示した。NMS をマウスの脳室内に投与すると用量依存的な心拍数増加が認められ、NMS 欠損マウスでは心拍数の低下が観察されることより、NMS の交感神経系を介した循環調節への関与も報告している。さらに、最近 NMU および NMS の各前駆体タンパク質から産生される新規ペプチドをラットの脳・小腸から精製を進め、これらペプチドが交感神経制御に関わっている可能性を示す知見を得た。以上より、我々が同定してきた脳腸ペプチドは、自律神経系を介した消化管-脳-心血管系ネットワークにより、循環制御に寄与していることを示しており、消化管ペプチドによる新たな循環調節機構と多様な作用に解明に結びついている。

また、我々が従来より継続している系統的な新規生理活性ペプチドの探索研究に関しては、探索研究で重要事項の一つである鋭敏且つ高感度な活性検出法の確立において、培養細胞の微小形態変化に基づくインピーダンス変化を指標とした高感度でハイスループットな新たな活性検出系 (CellKey system) を構築・導入し、スクリーニングに有用な系であることを実証してきた。従来の知見に新たな技術を導入することにより、生体制御に関与する新規因子の同定をもたすことが期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、多様な標的や作用を有する生理活性ペプチドに注目し、消化管と循環器系の臓器間ネットワーク機構に焦点をあて、新規生理活性ペプチドの探索を進めるとともに、ニューロメジン類などの消化管ペプチドの多様な作用の解明のための研究基盤の構築を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 迷走神経求心路を介する循環制御ネットワークに関与する新規ペプチドの探索

迷走神経求心路神経節において発現している G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の中で、結合するリガンドが不明で、かつペプチド性リガンドが想定される GPCR を選択し、クローニングを行い、その安定発現細胞株を樹立した。ラット、ブタ組織を材料として、酸抽出して得た可溶性ペプチド画分を、逆相 C18 カラムを用いて脱塩・濃縮後、SP-イオン交換・ゲル濾過クロマトグラフィーにて分画した。分画した各フラクションの一部をオーファン GPCR 安定発現細胞に作用させ、細胞内 Ca イオン濃度上昇を FLIPR system で、細胞内 cAMP 濃度の変動を β -スクリーニング技法を用いて、また、新たな活性検出系として、リガンドが細胞に作用した際に生ずる細胞のインピーダンス変化を指標とする CellKey system を用いたスクリーニングを実施した。

(2) ニューロメジン類とその関連ペプチドの機能解明

NMU 前駆体から生理活性ペプチドが切り出される際に見られる特徴的なアミノ酸配列情報から、NMU 以外の新規ペプチドと予想されたアミノ酸配列のうち、N 末端 20 残基を抗原としたポリクローナル抗体を作製した。本抗体を用いて抗体アフィニティーカラムを作製し、新規ペプチドの精製に使用した。新規ペプチドは、約 500g のラット脳を用いてペプチド抽出画分を作製し、上記抗体アフィニティーカラムを通した後、複数の逆相 HPLC を組み合わせて精製を行った。単離した新規ペプチドは、プロテインシーケンサーおよび質量分析装置にて構造決定した。また、新規ペプチドの免疫活性の検出は、ラジオイムノアッセイにて実施した。

8-9 週齢の雄性ラットの側脳室内にカニューレを留置し、生食あるいは合成した新規ペプチドの脳室内投与を行った。脳室内投与後、経時的に尾静脈より採血を施行し、血中の各種下垂体ホルモンをラジオイムノアッセイ法にて測定した。ドーパミン受容体アゴニストのプロモクリプチンおよびドーパミン受容体アンタゴニストのスルピリドは合成ペプチド投与の 10 分前に脳室内に投与し、ペプチド投与 20 分後に尾静脈から採血して、血中プロラクチン濃度を測定した。

5 週齢の雄性ラットから下垂体を取り出し、コラゲナーゼにて下垂体細胞を分離した。96 well

プレートに 5×10^4 細胞の濃度で播種して 2 日間培養した後、合成ペプチドを添加して 30 分間培養後の培養上清を採取し、プロラクチン濃度を測定した。

(3) 循環器およびその関連疾患モデル動物における生理活性ペプチドの治療応用の検討

C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) は、血管内皮細胞由来の局所因子として、特に循環器系組織における血管障害改善による抗炎症や線維化抑制作用等が知られている。循環器疾患の基盤となる肥満・糖尿病における CNP の新たな機能について明らかにするため、Tie2 プロモーターを用いた血管内皮特異的 CNP 過剰発現マウス (CNP-Tg) を作出した。高脂肪食性肥満における CNP-Tg の体重、脂肪組織重量、脂肪細胞サイズ、炎症性マーカー、インスリン感受性・耐糖能およびエネルギー代謝を測定し、血管内皮由来 CNP の作用を検討した。

4. 研究成果

(1) 迷走神経求心路を介する循環制御ネットワークに関与する新規ペプチドの探索

マイクロアレイ解析を用いて、マウス迷走神経求心路神経節で発現しているペプチド性リガンドが想定される 3 種類のオーファン GPCR を選択し、検討を進めた。1 種類の GPCR は機能的受容体として発現していない可能性が示唆されたため、他の 2 種類の GPCR について内因性リガンド探索を実施した。迷走神経は多くの内臓に分布しており、発現する受容体の多くは神経末端での局在が想定されるため、リガンド産生組織は末梢に存在する可能性が高い。そこで末梢臓器を中心に、ラットの胃、十二指腸、小腸、肝臓、骨格筋、内臓脂肪、皮下脂肪、精巣周囲脂肪、心房、心室、脳、小脳、下垂体、ブタの肝臓、脾臓、脊髄、視床下部、脳幹、嗅球、ウシの胸腺をそれぞれ酢酸抽出し、イオン交換、ゲル濾過クロマトグラフィーにて分画した組織抽出物をリガンド探索の出発材料とした。作製した受容体安定発現細胞に組織抽出画分を添加し、共役する G タンパク質に依存しない活性検出系 (CellKey system によるインピーダンス測定) を駆使することにより、標的受容体に特異的な活性を探索した。その結果、両 GPCR 発現細胞に対する強いインピーダンス変化を複数の組織抽出物より検出した。今後、活性画分を HPLC にて分離したサンプルについて、受容体発現細胞に添加し、標的受容体に対する特異性を検証する。

(2) ニューロメジン類とその関連ペプチドの機能解明

NMU 前駆体タンパク質に、NMU の産生とは関係のない部位に塩基性アミノ酸対が存在することを見出し、この前駆体タンパク質から新規生理活性ペプチドが産生されることを推測した。本ペプチドを NMU 前駆体関連ペプチド (NMU precursor-related peptide, NURP) と命名し、その存在を証明するために NURP の抗体を作製し、ラット脳からの精製を試みた。ゲル濾過クロマトグラフィーにて分画したラット脳抽出ペプチドに対して NURP に対するラジオイムノアッセイを実施し、遺伝子配列情報から予想された分子量の位置に免疫活性を検出することができた。抗体アフィニティーカラム、逆相 HPLC を用いて精製を行い、最終的に約 500g のラット脳から 33 アミノ酸残基からなる NURP33 と 36 アミノ酸残基からなる NURP36 を精製することができた。ラジオイムノアッセイにより NURP を産生する組織を検討したところ、ラットにおいて NMU 前駆体タンパク質の mRNA が強く発現している脳および下垂体、小腸で NURP の免疫活性を検出できた。

NURP の生理機能を明らかにするため、合成した NURP をラットの脳室内に投与し、血中の下垂体ホルモン濃度を測定した。NURP の脳室内投与により時間および容量依存的な血中プロラクチン濃度の増加が認められた。その作用が下垂体のプロラクチン産生細胞に対する直接作用か否かを明らかにするためにラット脳より初代培養下垂体細胞を採取し、NURP を添加したが、培養上清中のプロラクチン濃度の増加は認められなかった。NURP のプロラクチン分泌増加作用がドーパミンシグナル系を介しているかを明らかにするため、ドーパミン受容体アゴニストを前投与した後、NURP を脳室内投与して血中のプロラクチン濃度を測定したところ、ドーパミン受容体アゴニスト投与により NURP によるプロラクチン分泌促進作用が消失することが明らかとなった。NURP はドーパミン系シグナルを介してプロラクチン分泌の調節に関与している可能性が示唆された。

(3) 循環器およびその関連疾患モデル動物における生理活性ペプチドの治療応用の検討

CNP-Tg は野生型と比較して、肥満による内臓脂肪の重量、脂肪細胞サイズの増加が抑制されていた。内臓脂肪組織中のマクロファージの数や血中も含めた炎症性サイトカイン (TNF 等) も低下していた。また、耐糖能やインスリン抵抗性が改善し、インスリン投与による Akt のリン酸化が上昇していた。さらに、褐色脂肪組織の活性化 (UCP1 等の上昇) により酸素消費量も亢進していた。血管内皮由来 CNP の肥満病態に対する抗炎症、耐糖能改善、エネルギー消費亢進といった、新たな作用を明らかにし、CNP/GC-B 系の肥満およびその関連疾患に対する治療的としての可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

Hino J, Nakatani M, Arai Y, Tsuchida K, Shirai M, Miyazato M, Kangawa K. Overexpression of bone morphogenetic protein-3b (BMP-3b) in adipose tissues protects against high-fat

diet-induced obesity. *Int J Obes*, 41: 483-488, 2017. 査読有
DOI:10.1038/ijo.2017.15

Takayama T, Mori K, Tanaka A, Nomura E, Sohma Y, Mori M, Taguchi A, Taniguchi A, Sakane T, Yamamoto A, & Minamino N, Miyazato M, Kangawa K, Hayashi Y. Discovery of a human neuromedin U receptor 1-selective hexapeptide agonist with enhanced serum stability. *J Med Chem*, 60: 5228-5234, 2017. 査読有
DOI:10.1021/acs.jmedchem.7b00694

Mori K, Ida T, Fudetani M, Mori M, Kaiya H, Hino J, Nakahara K, Murakami N, Miyazato M, Kangawa K. Identification of neuromedin U precursor-related peptide and its possible role in the regulation of prolactin release. *Sci Rep*, 7: 10468, 2017. 査読有
DOI: 10.1038/s41598-017-10319-9

Bae CR, Hino J, Hosoda H, Arai Y, Son C, Makino H, Tokudome T, Tomita T, Kimura T, Nojiri T, Hosoda K, Miyazato M, Kangawa K. Overexpression of C-type Natriuretic Peptide in Endothelial Cells Protects against Insulin Resistance and Inflammation during Diet induced Obesity. *Sci Rep*, 7: 9807, 2017. 査読有
DOI: 10.1038/s41598-017-10240-1

Ensho T, Maruyama K, Mori K, Miyazato M, Kangawa K, Nakahara K, Murakami N. Neuromedin U precursor-related peptide (NURP) exerts neuromedin U-like sympathetic nerve action in the rat. *Biochem Biophys Res Commun*, 492: 412-418, 2017. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.08.084

Bae CR, Hino J, Hosoda H, Son C, Makino H, Tokudome T, Tomita T, Hosoda K, Miyazato M, Kangawa K. Adipocyte-specific expression of C-type natriuretic peptide suppresses lipid metabolism and adipocyte hypertrophy in adipose tissues in mice fed high-fat diet. *Sci Rep*, 8: 2093, 2018. 査読有
DOI: 10.1038/s41598-018-20469-z

Bae CR, Hino J, Hosoda H, Miyazato M, Kangawa K. C-type natriuretic peptide (CNP) in endothelial cells attenuates hepatic fibrosis and inflammation in non-alcoholic steatohepatitis. *Life Sci*, 209: 349-356, 2018. 査読有
DOI: 10.1016/j.lfs.2018.08.031

Ogawa Y, Tsuji M, Tanaka M, Miyazato M, Hino J. Bone morphogenetic protein (BMP)-3b gene depletion causes high mortality in a mouse model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Front Neurol*, 9: 3974, 2018. 査読有
DOI: 10.3389/fneur.2018.00397

Tokudome T, Otani K, Miyazato M, Kangawa K. Ghrelin and the heart. *Peptides*, 111: 42-46, 2019. 査読有
DOI: 10.1016/j.peptides.2018.05.006

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/biochemistry/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：日野 純

ローマ字氏名：HINO, Jun

所属研究機関名：国立研究開発法人国立循環器病研究センター

部局名：研究所

職名：室長

研究者番号（8桁）：40260351

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。